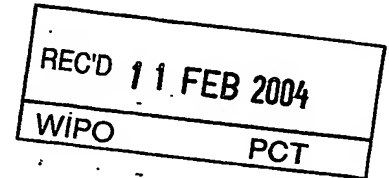


**BUNDEREPUBLIK DEUTSCHLAND****Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 06 084.7

**Anmeldetag:** 07. Februar 2003

**Anmelder/Inhaber:** Technische Universität Dresden,  
01069 Dresden/DE

**Bezeichnung:** Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle  
und die Verwendung dieser

**Priorität:** 06.12.2002 DE 102 58 117.7

**IPC:** A 61 K 48/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Januar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Wallner

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

5

---

**Gegen hTERT gerichtete Erkennungsmoleküle und die  
Verwendung dieser**

---

10

**Beschreibung**

15 Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die  
gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen  
Telomerase (hTERT) gerichtet sind sowie die Verwendung  
dieser Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe,  
Behandlung, Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum,  
20 -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang  
stehenden Krankheiten, wie beispielsweise Tumor-  
erkrankungen.

Es ist bekannt, dass die Replikation der Enden von  
25 eukaryotischen Chromosomen spezialisierte Zellbestandteile  
erfordert. Die Replikation eines linearen DNA-Stranges  
erfolgt in der Regel in 5'-3'-Richtung. Durch die  
Entfernung der zum äußeren 3'-Ende der chromosomalen DNA  
komplementären RNA-Primer, die für die Replikations-  
30 initiation essentiell sind, bleiben bei jeder  
Replikationsrunde die 5'-Enden neusynthetisierter DNA-  
Stränge unvollständig. Dadurch kommt es zu einer  
fortschreitenden Verkürzung der Tochterstränge bei jeder

Replikationsrunde (End-Replikationsproblem) [Levy et al.]. Diese Verkürzung an den als Telomere bezeichneten Chromosomenenden ist unter anderem für die Steuerung der Proliferationsfähigkeit und damit für die Alterung von  
5 Zellen verantwortlich [Harley]. Die Struktur dieser Telomere ist in zahlreichen lebenden Systemen untersucht.

Das Ribonukleoenzym Telomerase besitzt in einer Vielzahl von Organismen die Aufgabe, die Telomere proliferierender Zellen zu verlängern und zu stabilisieren, womit das End-Replikationsproblem nivelliert wird [Greider et al.]. Diese reverse Transkriptase besteht aus zwei essentiellen Untereinheiten: einer RNA-Komponente (hTR) und einer katalytischen Untereinheit (hTERT) [Beattie et al.].

15

Übereinstimmend mit der Beziehung zwischen Telomeren und der Telomerase sowie der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde in immortalisierten Zelllinien sowie in >85% der untersuchten Tumoren eine Telomerase -aktivität  
20 nachgewiesen [Kim et al.]. Diese korreliert mit der Expression der hTERT-Komponente, wie beim Harnblasenkarzinom gezeigt wurde [Ito et al.]. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen dem hTERT-Expressionsniveau im Harnblasenkarzinom und dem klinischen Verlauf der  
25 Tumorerkrankung bekannt (de Kok et al.). Daher ist die humane Telomerase ein ideales Ziel für die Diagnose und Behandlung menschlicher Krankheiten, die mit zellulärer Proliferation im Zusammenhang stehen, wie beispielsweise Krebs. Verfahren zur Diagnose und Behandlung von Krebs und  
30 anderen mit der Telomerase assoziierten Krankheiten sind unter anderem offenbart in der US 5 489 508 oder US

5 645 986. Die Hemmung der Telomerase wurde als spezifische Möglichkeit zur therapeutischen Kontrolle von Tumorzellen beschrieben. Wichtige Bemühungen, die Aktivität der Telomerase im Zusammenhang von Krebserkrankungen zu  
5 modifizieren, sind in der EP 666313, WO 97/37691 oder der WO 98/28442 offenbart. Derartige allgemeine Lehren offenbaren dem Fachmann aber keine konkreten Lehren zum technischen Handeln. Eine Substanz bzw. ein Molekül, das mit dem gesamten für hTERT kodierenden Sequenzbereich  
10 wechselwirkt, führt zwar dazu, dass die entsprechende Telomeraseaktivität - beispielsweise in einer Zellkultur - reduziert wird, derartige Substanzen eignen sich aber nicht zur Applikation in Organismen, da sie in der Regel viel zu groß sind und vom Immunsystem des betreffenden Organismus  
15 angegriffen und zerstört werden. Darüber hinaus kann eine Vielzahl unerwünschter Wechselwirkungen bzw. Nebenwirkungen auftreten. Aufgabe der Erfindung war es daher, alternative kompakte Moleküle bereitzustellen, die mit ausgewählten, spezifischen Struktureinheiten, die die Telomerase  
20 kodieren, einfach und effektiv inhibierend wechselwirken.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung eines Erkennungsmoleküls, das gegen eine mRNA der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase  
25 (hTERT) gerichtet ist, wobei das Erkennungsmolekül insbesondere mit Primärstrukturen dieser hTERT-mRNA in einem Zielsequenzbereich von 2000 bis 2500 gemäß dem Gendatenbankeintrag AF 015950 spezifisch interagiert. Die Zahlen repräsentieren - auch in folgenden Anschnitten - die  
30 entsprechenden Nukleotidpositionen innerhalb der hTERT-mRNA (Gesamtlänge 4015 Nukleotide). Die Erfindung betrifft also

die überraschende Lehre, dass gegen tumorassoziierte  
abnorme hTERT-mRNA-Expressionsmuster sowie Telomerase-  
aktivitätsniveaus durch eine mögliche hTERT-Inhibition mit  
den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen vorgegangen  
5 werden kann. Diese Erkennungsmoleküle sind gegen definierte  
hTERT-mRNA-Sequenzmotive im Bereich von 2000 bis 2500  
gerichtet. Sie können biologische und/oder chemische  
Strukturen sein, die in der Lage sind, so mit dem  
Zielsequenzbereich zu interagieren, dass eine spezifische  
10 Erkennung / Bindung und Wechselwirkung bestimmt werden  
kann. Beispiele für Erkennungsmoleküle können insbesondere  
Nukleinsäurekonstrukte, Antikörper bzw. andere zur  
Zielsequenz Affinität / Bindungsspezifität / Wechsel-  
wirkungsfähigkeit aufweisende Substanzen wie Affiline,  
15 Lektine, Aptamere oder andere Moleküle sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
interagiert das Erkennungsmolekül mit einem  
Zielsequenzbereich von 2100 bis 2400. Dieser Bereich ist  
20 vorteilhaft, um eine hTERT-Inhibition zu erreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
interagiert das Erkennungsmolekül mit einem Ziel-  
sequenzbereich von 2190 bis 2360. In diesem Bereich ist mit  
25 Vorteil eine besonders gute hTERT-Inhibition erreichbar.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform  
interagiert das Erkennungsmolekül spezifisch mit dem Ziel-  
sequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder von 2318 bis  
30 2346. Vorteilhafterweise ist in diesen Sequenzbereichen  
eine besonders effiziente hTERT-Inhibition möglich.

Bevorzugt sind ebenfalls kürzere Bereiche mit Veränderungen innerhalb dieser Zielsequenzen oder mit veränderten Randbereichen oder unterschiedlichen Derivatisierungen/Modifizierungen/Fusionen/Komplexierungen, die auch mit  
5 anderen Erkennungsmolekülen kombiniert und/oder gekoppelt sein können.

Durch diese bevorzugten Zielsequenzbereiche ist es dem Fachmann möglich, insbesondere sehr kleine und/oder  
10 kompakte Erkennungsmoleküle bereitzustellen, die im Wesentlichen nicht mit anderen Strukturen, insbesondere immunologischen Abwehrstrukturen, innerhalb des Zellgewebes bzw. des Organismus interagieren oder von diesen angegriffen werden, sondern spezifisch mit dem  
15 Zielsequenzbereich der hTERT-mRNA interagieren können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Sequenzbereich oder das Erkennungsmolekül durch Addition, Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation, Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder Substitution modifiziert ist. Diese Modifikationen können beispielsweise beim Erkennungsmolekül dazu führen, dass es mit einer höheren Avidität oder Spezifität an die mRNA der katalytischen hTERT-Untereinheit  
20 bindet. Es kann jedoch selbstverständlich auch vorgesehen sein, dass das Erkennungsmolekül mit geringerer Spezifität oder Avidität bindet. Bei den Mutationen im hTERT-Sequenzbereich kann es sich im Sinne der Erfindung zum Beispiel um vererbzbare oder nicht vererbzbare Veränderungen  
25 handeln. Die Modifikationen können so beschaffen sein, dass sie direkt auf der mRNA-Ebene oder auf der DNA-Ebene  
30

detektierbar werden. Zu den Mutationen können beispielsweise auch Mutationen im Zusammenhang mit einer zytologisch sichtbaren Genom- und/oder Chromosomenmutationen zählen, die mit Veränderungen der hTERT assoziiert sind. Derartige Mutationen können dadurch entstehen, dass Teile des Chromosoms verloren gehen, verdoppelt werden, in umgekehrter Orientierung vorliegen oder auf andere Chromosomen übertragen werden. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass die Mutation nur ein oder wenige benachbarte Basenpaare betrifft, wie dies beispielsweise bei der Punktmutation der Fall ist. Geht beispielsweise ein Basenpaar in Form einer Deletion verloren oder wird ein Basenpaar zusätzlich, wie bei der Insertion, eingeschoben, so verschiebt sich das Leseraster des betroffenen Gens zu einer Leserastermutation. Bei der Substitutionsmutation im Sinne der Erfindung wird beispielsweise eine Base gegen eine andere ausgetauscht, wobei die daraus resultierenden Konsequenzen unterschiedlich sein können:

(a) Es kann beispielsweise ein Kodon in ein synonymes Kodon umgewandelt werden,

(b) oder die Mutation verändert die Kodonspezifität und führt damit zum Einbau anderer Aminosäuren bzw.

(c) durch die Mutation wird die Translation an einer bestimmten Stelle beendet, wobei die gebildeten hTERT-Fragmente inaktiv oder aktiv sein können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Erkennungsmolekül ein Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin und/oder ein Antikörper. Nukleinsäurekonstrukte im Sinne der Erfindung können alle Strukturen sein, die im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basieren oder deren aktives Zentrum im Wesentlichen auf Nukleinsäuren basiert. Es kann selbstverständlich möglich sein, dass das gesamte Erkennungsmolekül vor allem aus Lipiden, Kohlenhydraten oder Proteinen bzw. Peptiden besteht - beispielsweise in Form einer Nanokapsel - und dieses Konstrukt einen Bereich umfasst, der Nukleinsäuren enthält, die mit hTERT wechselwirken können. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, derartige Konstrukte bereitzustellen. Ein Chelator im Sinne der Erfindung ist eine Sammelbezeichnung für zyklische Verbindungen, bei denen Metalle, Gruppierungen mit einsamen Elektronenpaaren oder mit Elektronenlücken und Wasserstoff an der Ringbildung beteiligt sind und die weiterhin in der Lage sind, mit der hTERT-mRNA spezifisch zu interagieren. Die Koordinationsverbindungen der Metalle, die im Sinne der Erfindung als Metallchelatoren bezeichnet werden können, sind besonders vorteilhaft. Es sind Verbindungen, in denen ein einzelner Ligand mehr als eine Koordinationsstelle an einem Zentralatom besetzt, das heißt mindestens zweizellig ist. In diesem Falle werden normalerweise gestreckte Verbindungen durch Komplexbildung über ein Metallatom oder -ion zu Ringen geschlossen, wobei diese Ringe in der Lage sind, spezifisch mit der hTERT-mRNA zu interagieren. Ein Lektin im Sinne der Erfindung ist insbesondere ein Phytohämagglutinin, häufig ein Pflanzenprotein, das aufgrund seiner hohen Affinität zu bestimmten Komponenten



an der Oberfläche bestimmter Nukleinsäurestrukturen spezifisch binden und agglutinieren kann. Insbesondere wechselwirken Lektine mit Zuckerstrukturen, die mit spezifischen Sequenzbereichen einer Nukleinsäure assoziiert sein können. Ein Antikörper im Sinne der Erfindung bindet die genannten hTERT-Zielbereiche spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (zum Beispiel oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörperfragmente, die bestimmte Determinanten des Zielbereiches binden. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

(1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;

(2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;

(3) F(ab')<sub>2</sub>, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem

Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt;  $F(ab')_2$  ist eine Dimer von zwei  $Fab'$ -Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

5 (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

10 (5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäurekonstrukt ein Antisense(AS)-Oligonukleotid (ON), ein DNazym, ein Ribozym, eine siRNA und/oder eine

20 Peptid-Nukleinsäure (PNA)..

Bei AS-Konstrukten handelt es sich um synthetisch hergestellte Moleküle, die eine selektive Inhibition der Biosynthese ausgewählter Proteine ermöglichen. Zum Einsatz

25 kommen zum Beispiel ON, PNAs, Ribozyme, DNazyme. Die AS-Wirkung beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung der Konstrukte durch Watson-Crick-Basenpaarung mit der für das zu reprimierende Protein kodierenden Ziel-mRNA, was über verschiedene Mechanismen zu einer Verhinderung der

30 Proteinsynthese führt (Tab.1).

Tab. 1 AS-Effekte und ihre Wirkungsmechanismen  
ss - "single stranded" (Einzelstrang)

Effekt	Mechanismus	Referenzen
Transkriptionsinhibition	Bindung der AS-Konstrukte an genomische DNA durch Hoogsten-Triplex-Bildung	[Moser et al.]
Modulation der RNA-Prozessierung	a) Blockierung von Spleißstellen führt zur Verhinderung des Spleißvorgangs b) Verhinderung der Polyadenylierung destabilisiert die mRNA c) Behinderung des mRNA-Transports ins Zytoplasma	[Kole et al., Crooke]
Hemmung der Translation	kompetitive Bindung des AS-Konstrukts an die Ziel-mRNA verhindert Initiations- bzw. Elongationsprozess	[Boiziau et al.]
Spaltung der Ziel-mRNA	a) selektiver Abbau des RNA-Stranges in RNA-DNA-Hybriden durch die Endonuklease RNase H b) Abbau von ss-RNA durch die Endonuklease RNase L nach Aktivierung durch 2',5'-Tetraadenylatmodifizierte ON c) durch Ribozyme/DNAzyme katalysierte, sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA	[Crooke, Agrawal et al., Sun et al.]

5

Die Entwicklung von AS-ON als therapeutische Substanzen stellt neben verschiedenen anderen Anwendungsfeldern auch ein neues erfolgversprechendes Therapiekonzept für

onkologische Erkrankungen dar [Tamm et al.]. Während es bei der konventionellen Chemotherapie zu einer unspezifischen Hemmung der Zellproliferation kommt, werden mit der AS-Therapie ganz gezielt solche mRNAs inaktiviert, die die molekulare Grundlage oder einen wesentlichen Bestandteil des entarteten, deregulierten Wachstums und der Tumorprogression darstellen sowie für die Inhibierung der körpereigenen Immunabwehr verantwortlich sein können.

AS-ON unterscheiden sich von anderen Therapeutika, wie Antikörpern, Toxinen oder Immuntoxinen dahingehend, dass es sich um relativ kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von üblicherweise etwa 5 kDa handelt. Die geringe Größe der AS-ON ermöglicht eine gute Gewebepenetration. Außerdem ist bekannt, dass Tumorblutgefäße im Gegensatz zu Blutgefäßen normaler Gewebe für Substanzen in einem Größenbereich zwischen 4-10 kDa durchlässig sind. Das bedeutet, dass therapeutische AS-ON gezielt Tumorblutgefäße penetrieren können. Ein weiterer Vorteil dieser Substanzen, zum Beispiel gegenüber Antikörpern, die nahezu ausschließlich gegen extrazelluläre Proteine wirksam sind, besteht darin, dass über die jeweilige Ziel-mRNA prinzipiell alle, also sowohl zytoplasmatische als auch kernlokalisierte sowie membranständige Proteine angegriffen werden können.

Die gegen einen Nuklease-Angriff relativ resistenten Phosphorothioat-AS-ON werden gegenwärtig in einer Reihe von klinischen Studien (Phase I-III) hinsichtlich ihres Potentials als Anti-Krebs-Therapeutika evaluiert. Dabei werden in Tumoren überexprimierte Ziel-mRNA-Moleküle angegriffen.

Bei Verwendung der Phosphothioat-ON (PS-ON) wurde eine Reihe von unerwarteten, so genannten "non-AS"-Effekten beobachtet, die zudem zu einer unspezifischen Hemmung des Zellwachstums führen können. Diese Effekte sind stark von der ON-Sequenz bzw. von bestimmten Sequenzmotiven abhängig und treten auf Grund der starken polyanionischen Ladung der PS-ON auf, welche eine Bindung der PS-ON an lebenswichtige Proteine zur Folge haben kann. Die erwähnten negativen Effekte können insbesondere durch Verwendung von partiell phosphothioat-modifizierten AS-ON oder durch weitere Modifikationen, z.B. Einbau von Ribonukleotiden anstatt Desoxyribonukleotiden, überwunden werden. Eine partielle endständige Modifizierung von ON-Konstrukten (bevorzugt 2 bis 5 Bindungen vom 3'- und 5'-Nukleinsäureterminus sind modifiziert) bietet eine erhöhte Stabilität im extra- und intrazellulären Milieu der Zielzellen (Schutz vor Abbau durch Exonukleasen), insbesondere bei einer Applikation *in vivo*. Ein positiver Nebeneffekt, der bei Verwendung der PS-ON beobachtet wurde, ist deren immunstimulatorische Wirkung, die bei einigen Tumoranwendungen durchaus einen möglichen Therapieerfolg unterstützen kann.

Zur Erhöhung der Stabilität und Spezifität von AS-ON und zur Verminderung der „non-AS“-Effekte können weitere chemische Modifikationen zum Einsatz kommen, z.B. Einbau von 2'-O-Methylribonukleotiden, Methylphosphonat-Segmenten, „locked nucleic acids“ (Methylenbrücke zwischen 2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff der Ribose), Austausch des Cytosins durch 5'-Methylcytosin und/oder eine 2'-5'-Tetraadenylat-Modifizierung.

Dabei kann es sich sowohl um partiell modifizierte oder vollständig via dieser chemischen Modifikation veränderte ON-Konstrukte handeln.

5

Ribozyme sind als katalytisch aktive RNA-Moleküle in der Lage, zelluläre RNA-Strukturen als Substrate zu erkennen und sequenzspezifisch an einer Phosphordiesterbindung zu spalten. Die Erkennung erfolgt über AS-Arme, die aufgrund komplementärer Sequenzen eine Hybridisierung mit der Ziel-mRNA ermöglichen. Gegenüber AS-ON besitzen Ribozyme den grundsätzlichen Vorteil, dass ein Ribozym-Molekül als echter Katalysator eine große Anzahl identischer Substratmoleküle umsetzen kann. Daher sind Ribozyme bereits in wesentlich geringerer Konzentration als ON wirksam und führen darüber hinaus durch die Substrat-Spaltung zu einem irreversiblen RNA-Abbau [Sun et al.].

20

Unter den bisher bekannten Ribozymtypen ist das Hammerhead-Ribozym (Review: Birikh et al., 1997; Tanner, 1999) für derartige Anwendungen besonders interessant, weil es als vergleichsweise kleines Molekül (ca. 30-50 Nukleotide) bereits katalytisch aktiv sein kann. Ein sehr wirksames trans-spaltendes Hammerhead-Ribozym besteht zum Beispiel aus lediglich 14 konservierten Nukleotiden in der katalytischen Domäne und zwei variablen Stammsequenzen (vorteilhafterweise aus jeweils 6-8 Nukleotiden), die durch Watson-Crick-Basenpaarung (analog der AS-ON) die sequenzspezifische Erkennung des zu spaltenden Substrates realisieren und dieses anschließend durch Spaltung einer Phosphordiester-Bindung inaktivieren. In dieser Form lässt

30

sich praktisch gegen jedes beliebige RNA-Molekül, welches eine potentielle Spaltstelle mit der minimalen Sequenzanforderung -NUX- besitzt, ein spezifisch spaltendes Hammerhead-Ribozym konstruieren und somit beispielsweise  
5 zelluläre mRNA oder virale RNA inhibieren. Weitere katalytische Nukleinsäuren vom DNA-Typ (z.B. DNzyme) sind analog einsetzbar.

RNAi ("RNA interference") ist eine neue Methodik, die eine spezifische Geninhibition von Zielmolekülen auf mRNA-Ebene ermöglicht. Hierfür müssen doppelsträngige RNA-Moleküle („small interference RNA“, siRNA) mit ihren zwei Nukleotiden langen 3'-Überhängen, bestehend bevorzugt aus Thymidin-Nukleotiden, in Zellen transfiziert werden.  
15 Zunächst erfolgt eine Assoziation der siRNA-Konstrukte mit spezifischen zellulären Proteinen, gefolgt durch die Erkennung der Ziel-mRNA-Sequenz aufgrund der Komplementarität des AS-si-RNA-Stranges. Die intrinsische Endonukleaseaktivität des Ribonukleoproteinkomplexes  
20 ermöglicht eine spezifische Degradation der zu inhibierenden mRNA.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das AS-ON ein PS-ON bzw. ein mit weiteren chemischen  
25 Veränderungen modifiziertes Nukleinsäurekonstrukt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Sequenzbereich der hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär ist, ausgewählt aus der  
30 Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225, 2315-2334, 2317-2336, 2324-2346, , 2331-2350 und/oder 2333-2352.

Mit diesen Sequenzbereichen ist es vorteilhafterweise möglich, die hTERT-Expression zu inhibieren. Durch die Inhibition können unter anderem Krankheiten, die mit der Expression dieses Gens assoziiert sind, unterdrückt werden, wie zum Beispiel Tumoren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül immobilisiert. Im Sinne der Erfindung werden unter Immobilisierung verschiedene Verfahren und Techniken zum Fixieren der Erkennungsmoleküle auf bestimmten Trägern verstanden. Die Immobilisierung kann beispielsweise der Stabilisierung der Erkennungsmoleküle dienen, wodurch diese insbesondere bei Lagerung oder bei einmaligem Batch-Ansatz durch biologische, chemische oder physikalische Einwirkungen in ihrer Aktivität nicht reduziert oder nachteilig modifiziert werden. Durch die Immobilisierung der Erkennungsmoleküle ist ein wiederholter Einsatz unter technischen oder klinischen Routine-Bedingungen möglich; weiterhin kann die Probe mit den Erkennungsmolekülen kontinuierlich umgesetzt werden. Dies kann insbesondere durch verschiedene Immobilisierungstechniken erreicht werden, wobei die Bindung der Erkennungsmoleküle an andere Erkennungsmoleküle oder Moleküle bzw. an einen Träger so erfolgt, dass die dreidimensionale Struktur am aktiven Zentrum der entsprechenden Moleküle, insbesondere der Erkennungsmoleküle, nicht verändert wird. Vorteilhafterweise geht die Spezifität zu hTERT und die Spezifität der eigentlichen Bindungsreaktion durch die Immobilisierung nicht verloren. Im Sinne der Erfindung



können drei grundsätzliche Methoden zur Immobilisierung verwendet werden:

(i) Quervernetzung: Bei der Quervernetzung werden die  
5 Erkennungsmoleküle miteinander fixiert, ohne dass ihre  
Aktivität nachteilig beeinflusst wird. Sie sind  
vorteilhafterweise durch die Quervernetzung nicht mehr  
löslich.

(ii) Bindung an einen Träger: Die Bindung an einen Träger  
erfolgt zum Beispiel durch Adsorption, Ionenbindung oder  
kovalente Bindung. Dies kann auch innerhalb von  
mikrobiellen Zellen bzw. Liposomen oder anderen  
membranhaltigen geschlossenen bzw. offenen Strukturen  
15 erfolgen. Das Erkennungsmolekül wird durch die Fixierung  
vorteilhafterweise nicht in seiner Aktivität beeinflusst.  
Es kann mit Vorteil zum Beispiel in der Klinik in Diagnose  
oder Therapie trägergebunden mehrfach oder kontinuierlich  
eingesetzt werden.

20

(iii) Einschluss: Der Einschluss erfolgt im Sinne der  
Erfindung insbesondere in eine semipermeable Membran in  
Form von Gelen, Fibrillen oder Fasern. Gekapselte  
Erkennungsmoleküle sind durch eine semipermeable Membran so  
25 durch die umgebende Probenlösung getrennt, dass sie  
vorteilhafterweise noch mit der katalytischen Untereinheit  
der humanen Telomerase oder mit Fragmenten dieser  
interagieren können.

30 Für die Immobilisierung stehen verschiedene Verfahren zur  
Verfügung, wie beispielsweise die Adsorption an einen

inerten oder elektrisch geladenen anorganischen oder organischen Träger. Solche Träger können beispielsweise poröse Gele, Aluminiumoxid, Betonid, Agarose, Stärke, Nylon oder Polyacrylamid sein. Die Immobilisierung erfolgt  
5 hierbei durch physikalische Bindungskräfte, oft unter Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen und ionischen Bindungen. Derartige Methoden sind vorteilhafterweise einfach zu handhaben und sie beeinflussen die Konformation der Erkennungsmoleküle nur in geringem Umfang. Durch  
10 elektrostatische Bindungskräfte zwischen den geladenen Gruppen der Erkennungsmoleküle und dem Träger kann die Bindung vorteilhafterweise verbessert werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Ionenaustauschern, wie zum Beispiel Sephadex. Ein weiteres Verfahren ist die kovalente  
15 Bindung an Trägermaterialien. Die Träger können dazu reaktive Gruppen aufweisen, die mit Aminosäure-Seitenketten homöopolare Bindungen eingehen. Geeignete Gruppen in Erkennungsmolekülen sind Carboxy-, Hydroxy- und Sulfidgruppen und insbesondere die endständigen  
20 Aminogruppen von Lysinen. Aromatische Gruppen bieten die Möglichkeit für Diazo-Kupplungen. Die Oberfläche von mikroskopischen porösen Glasparkeln kann durch Behandlung mit Silanen aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen besetzt werden. Hydroxy-Gruppen  
25 natürlicher Polymere können zum Beispiel mit Bromzyan aktiviert und anschließend mit Erkennungsmolekülen gekoppelt werden. Mit Polyacrylamid-Harzen können zahlreiche Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise direkte kovalente Bindungen eingehen. Bei dem Einschluss in  
30 dreidimensionale Netzwerke werden die Erkennungsmoleküle in ionotrophe Gele oder andere dem Fachmann bekannte

Strukturen eingeschlossen. Die Poren der Matrix sind insbesondere so beschaffen, dass die Erkennungsmoleküle zurückgehalten werden und eine Interaktion mit den Ziel-Molekülen möglich ist. Bei der Quervernetzung werden die

5 Erkennungsmoleküle durch Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien in polymere Aggregate umgewandelt. Derartige Strukturen sind gelatinös und leicht verformbar und insbesondere für den Einsatz in verschiedenen Reaktoren geeignet. Durch Zugabe anderer inaktiver Komponenten, wie

10 zum Beispiel Gelatine, bei der Vernetzung können die mechanischen und enzymatischen Eigenschaften vorteilhafterweise verbessert werden. Bei der Mikroverkapselung wird der Reaktionsraum der Erkennungsmoleküle mit Hilfe von Membranen eingegrenzt. Die

15 Mikroverkapselung kann zum Beispiel als Grenzflächen-Polymerisation durchgeführt werden. Durch die Immobilisierung bei der Mikroverkapselung werden die Erkennungsmoleküle unlöslich und dadurch wiederverwendbar. Im Sinne der Erfindung sind immobilisierte

20 Erkennungsmoleküle alle Erkennungsmoleküle, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverwendung erlaubt. Die Einschränkung der Beweglichkeit und der Löslichkeit der Erkennungsmoleküle auf chemischem, biologischem oder physikalischem Wege führt vorteilhafterweise zu niedrigen

25 Verfahrenskosten.

Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, gegebenenfalls in einer Kombination mit

30 einem pharmazeutisch verträglichen Träger. Dieser pharmazeutische Träger kann insbesondere zusätzliche Stoffe

und Substanzen, wie beispielsweise medizinische und/oder pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe, umfassen.

Medizinische Hilfsstoffe sind beispielsweise solche Stoffe, die zur Produktion als Ingredienzien von pharmazeutischen

5 Zusammensetzungen eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung oder des Arzneimittels und können sogar - sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden - anschließend

10 entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Trägersubstanzen Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Die pharmazeutische Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel. Hierbei kann es sich

15 beispielsweise um phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Wasser, Emulsionen, wie beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen und ähnliches handeln. Die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung kann beispielsweise im  
20 Zusammenhang mit einer Gentherapie geschehen.

Im Sinne der Erfindung ist eine Gentherapie eine Behandlungsform unter Einsatz von natürlichen oder rekombinant veränderten Nukleinsäure-Konstrukten, einzelner  
25 Gensequenzen oder ganzer Gen- bzw. Chromosomenabschnitte bzw. kodierter Transkriptbereiche, deren Derivate/Modifizierungen mit dem Ziel einer biologisch-basierten und selektiven Hemmung bzw. Revertierung der Krankheitssymptome und/oder deren kausalen Ursachen, wobei im speziellen Fall  
30 darunter die Inhibition eines im Verlauf einer Krankheit

überexprimierten Zielmoleküls auf Ebene der Nukleinsäuren, insbesondere auf der Transkriptebene, verstanden wird.

Die Genterapie kann beispielsweise auch über geeignete  
5 Vektoren, wie beispielsweise virale Vektoren oder/und eine  
Komplexierung mit Lipiden oder Dendrimeren erfolgen. Die  
Genterapie kann insbesondere auch über die Verpackung in  
Proteinhüllen erfolgen. Weiterhin ist es möglich, dass das  
Erkennungsmolekül mit einem weiteren Molekül fusioniert  
10 oder komplexiert ist, welches den gerichteten Transport zum  
Zielort, die Aufnahme in und/oder die Verteilung innerhalb  
der Zielzelle unterstützt. Die Art der Dosierung und des  
Verabreichungsweges kann vom behandelnden Arzt entsprechend  
den klinischen Anforderungen bestimmt werden. Es ist dem  
15 Fachmann bekannt, dass die Art der Dosierung von  
verschiedenen Faktoren abhängig ist, wie beispielsweise der  
Größe, der Körperoberfläche, dem Alter, dem Geschlecht oder  
dem allgemeinen und krankheitsspezifischen Gesundheits-  
zustand des Patienten, aber auch von dem speziellen Mittel,  
20 welches verabreicht wird, der Dauer und Art der  
Verabreichung und von anderen Medikamenten, die  
möglicherweise parallel, insbesondere in einer  
Kombinationstherapie, verabreicht werden.

25 Die Erfindung betrifft auch einen Kit umfassend das  
Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische  
Zusammensetzung. Weiterhin betrifft die Erfindung auch ein  
Array umfassend das Erkennungsmolekül und/oder die  
pharmazeutische Zusammensetzung. Der Kit und der Array  
30 können zur Diagnose und/oder Therapie von Krankheiten  
eingesetzt werden, die mit der Funktion der katalytischen

Untereinheit der humanen Telomerase assoziiert sind. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Erkennungsmoleküls, des Kits, des Arrays zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle  
 5 und/oder Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mit Zellwachstum, -differenzierung und/oder -teilung im Zusammenhang stehende Krankheit ein Tumor. Besonders bevorzugt ist der Tumor ein solider Tumor und/oder ein Blut- oder Lymphdrüsenkrebs.

15 Insbesondere kann es sich bei den Tumoren, die epithelialen oder mesodermalen Ursprungs sein können, im Sinne der Erfindung um gut- oder bösartige Krebsarten der Organe der Lunge, der Prostata, der Harnblase, der Niere, der Speiseröhre, des Magens, der Bauchspeicheldrüse (Pankreas),  
 20 des Hirns, des Ovars, des Skelettsystems handeln, wobei besonders das Adenokarzinom der Brust, der Prostata, der Lunge und des Darms, Knochenmarkkrebs, das Melanom, das Hepatom, die Kopf-Hals-Tumoren explizit als Vertreter bösartiger (so genannte maligne) Tumoren bevorzugt sind.

25 Zur Gruppe der Blut- und Lymphdrüsenkrebsarten werden im Sinne der Erfindung alle Formen von Leukämien (z.B. in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie,  
 30 akute lymphatische Leukämie, chronisch-lymphatische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie) und

Lymphomen gezählt. Beispiele von mesenchymalen bösartigen Tumoren (sogenannte Knochen- und Weichteilsarkome) sind: Fibrosarkom; das maligne Histiozytom; das Liposarkom; Hämangiosarkom; das Chondrosarkom und das Osteosarkom; 5 Ewing-Sarkom; das Leio- und Rhabdomyosarkom, das Synovialsarkom; Karzinosarkom. Als weitere Tumorarten, die im Sinne der Erfindung auch unter dem Begriff „Neoplasmen“ zusammengefasst werden, sind bevorzugt: Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, 10 colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts).

15

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt oder verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren 20 Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, 25 Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, 30 der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren der Zervix, der

Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren

5 der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren, Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokulare

10 Melanome, Tumoren des zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor, Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom-Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome des zentralen

15 Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale

20 Karzinomastose, Immunsuppression-bedingte Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom, AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziierten Morbus Hodgkin und AIDS-assoziierte anogenitale Tumoren, Transplantations-

25 bedingte Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnmetastasen, Lungenmetastasen, Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.



In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem soliden Tumor um einen Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des Gastrointestinaltraktes.

5 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass der Tumor ein Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreaskarzinom, ein Dickdarmkrebs, ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom, ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein Nierenzellkarzinom,  
10 ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor, ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren/Karzinome ist.

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform ist der solide Tumor ein Mamma-, Bronchial-, Kolorektal-  
15 und/oder Prostatakarzinom.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Tumor des Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom (BCa). Das BCa stellt in der Bundesrepublik Deutschland die  
20 vierthäufigste Krebsform und siebthäufigste Krebstodesursache bei Männern dar. Die TUR-B als generelle Primärtherapie des BCa erlaubt eine organerhaltende Entfernung von oberflächlichen Tumoren. Trotz dieser histopathologisch definierten vollständigen Entfernung des  
25 Tumors ist mit 50-70 % der Patienten ein relativ hoher Anteil innerhalb von zwei Jahren von einem Rezidiv betroffen [Stein et al.]. Ein Diagnose- sowie Therapieproblem stellt das synchrone oder metachrone multifokale Auftreten von Tumorherden dar, wodurch das  
30 Auftreten von Rezidiven entfernt von der resezierten Primärtumorlokalisation bedingt sein kann [Sidransky et

al.]. Bei Auftreten eines Rezidivs oder bei primär als oberflächlich eingestuften Tumoren erfolgt in der Regel nach der TUR-B eine Langzeitprophylaxe mit einem Immun- (Bazillus Calmette-Guérin - BCG) oder Chemotherapeutikum (z. B. Mitomycin-C, Taxol, Gemcitabin/Cisplatin). Patienten mit muskelinvasiven BCa und mit entdifferenzierten, oberflächlichen Tumoren, die trotz dieser Therapie rezidivieren, werden in der Regel radikal zystektomiert bzw. unter Erhalt der Blase mittels Mono-/Polychemo-, Immun- oder Strahlentherapie bzw. Kombinationsverfahren dieser Methoden behandelt. Chemo-, Immun- oder Strahlenbehandlungen sind aufgrund ihrer relativ unspezifischen Wirkmechanismen von einer hohen therapieinduzierten Toxizität begleitet.

Aufgrund der gesundheitspolitischen Bedeutung des BCa (insbesondere in den westlichen Industrieländern), dem Fehlen tumorspezifischer Marker sowie der bekannten tumorbiologischen und zellulären Heterogenität des Tumors gibt es eine intensive Suche auf dem klinischen Forschungsgebiet zum BCa, die insbesondere auf die Identifizierung neuer oder/und ergänzender Therapieoptionen zielen.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden das Erkennungsmolekül, die pharmazeutische Zusammensetzung, der Kit und/oder der Array für eine Verlaufskontrolle verwendet, die im Wesentlichen eine Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung darstellt. Weiterhin ist es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül in einer Kombinationstherapie, insbesondere zur Behandlung von

Tumoren, verwendet wird. Besonders bevorzugt ist hierbei, dass die Kombinationstherapie eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/oder eine Strahlentherapie umfasst. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der

5 Erfindung ist die Kombinationstherapie eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei, dass diese Therapieform eine Immuntherapie ist. Weiterhin ist besonders bevorzugt, dass die Kombinationstherapie eine Gentherapie und/oder eine

10 Therapie mit einem Erkennungsmolekül gegen dasselbe oder ein anderes Zielmolekül umfasst. Dem Fachmann sind verschiedene Kombinationstherapien, insbesondere zur Behandlung von Tumoren, bekannt. Es kann zum Beispiel vorgesehen sein, dass innerhalb einer Kombinationstherapie

15 eine Zytostatikabehandlung erfolgt oder beispielsweise eine Bestrahlung eines bestimmten Tumorareals, wobei diese Behandlung mit einer Gentherapie kombiniert wird, wobei das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül als Antikrebsmittel eingesetzt wird. Das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül

20 kann jedoch auch in Kombination mit anderen Erkennungsmolekülen eingesetzt werden. Demgemäß kann es ganz besonders bevorzugt sein, dass das Erkennungsmolekül zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen verwendet wird. Weiterhin ist

25 es bevorzugt, dass das Erkennungsmolekül zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen und/oder zur Induktion von Apoptose und eines Zellzyklus-Arrests verwendet wird.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispiels näher erläutert werden, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein.

## 5 Beispiel

Die gut transfizierbare humane Harnblasenkarzinom-Zelllinie EJ28 zeigte nach Transfektion insbesondere bei Verwendung von fünf spezifischen anti-hTERT-AS-Konstrukten (vgl. Tab. 2) eine unmittelbar einsetzende und kontinuierliche Reduktion ihrer Viabilität um mehr als 65 % gegenüber der Nonsense (NS)-Kontrolle (vgl. Abb. 2). Dabei war die Beobachtung besonders auffällig, dass vier der wirksamsten Konstrukte gegen ein einzelnes mRNA-Sequenzmotiv gerichtet waren.

Bereits nach vier von fünf Behandlungen mit dem Konstrukt AStel2331-50 waren nahezu keine lebenden Zellen mehr im Kulturgefäß nachweisbar. Die Behandlung telomerasenegativer humaner Fibroblasten führte hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen AS- und NS-ON-behandelten Zellen, was eine Spezifität der AS-O-N-Wirkung auf die BCa-Zelllinie EJ28 indirekt belegt (Daten nicht gezeigt). Die AS-spezifische Wirksamkeit wurde anschließend detailliert untersucht: in Übereinstimmung mit dem Viabilitätstest konnte in Bezug auf das Proliferations- und Zellkoloniebildungsverhalten (Abb. 4) ein Hemmeffekt dieser fünf AS-ON belegt werden. Zudem konnte die AS-spezifische Verringerung des Zellanteils in der DNA-Synthesephase (bis ca. 30 %) in Richtung einer G1-Arretierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Beweis für die AS-

spezifische Wirkung der gegen die Ziel motive gerichteten AS-ON wurde in Form einer signifikanten und zeitabhängigen Reduktion der hTERT-Transkriptmenge erbracht (Abb. 3). In Übereinstimmung damit wurde auch die hTERT-Proteinexpression reprimiert. Außerdem wurde als Folge davon die Telomeraseaktivität der EJ28-Zellen um mehr als 60 % gehemmt (Daten nicht gezeigt).

Tab. 2 hTERT-AS- und NS-ON: Nukleotid- und Zielsequenzen

Bezeichnung <sup>1</sup>	ss-Motiv <sup>2</sup>	Sequenz <sup>3</sup> (5' → 3')
AS-ON		
ASel2206-2225	2191-2224	tgtcctgggggatggtgtcg
ASel2315-2334	2318-2346	ttgaaggccttgccgacgtg
ASel2317-2336		tcttgaaggccttgccgacg
ASel2331-2350		ggtagagacgtggctcttga
ASel2333-2352		aaggtagagacgtggctctt
NS-ON		
NS-K2	-	cagtctcagtactgaagctg
NS-K3		cagcttcagtactgagactg

<sup>1</sup> Der Name beinhaltet den Sequenzbereich der hTERT-mRNA (Acc. No.: AF015950), zu der das jeweilige AS-ON komplementär ist; <sup>2</sup> Die dargestellten Motive enthalten am 5'- und 3'-Terminus jeweils 10 nt doppelsträngige RNA;

<sup>3</sup> Die fett gedruckten Nukleotide stellen den Bereich im AS-ON dar, der komplementär zur ss-Region des Zielmotivs ist.

5

**Patentansprüche**

10

1. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit der mRNA der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase in einem Zielsequenzbereich von 2000 bis 2500 gemäß der Accession number AF015950 spezifisch interagiert.

15

20

2. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2100 bis 2400 spezifisch interagiert.

25

3. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2190 bis 2360 spezifisch interagiert.

30

4. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül mit dem Zielsequenzbereich von 2191 bis 2224 und/oder von 2318 bis 2346 spezifisch interagiert.

5. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich  
und/oder das Erkennungsmolekül durch Addition,  
5 Amplifikation, Inversion, Missense-Mutation,  
Nonsense-Mutation, Punktmutation, Deletion und/oder  
Substitution modifiziert ist.

6. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül  
10 immobilisiert ist.

7. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül ein  
15 Nukleinsäurekonstrukt, ein Chelator, ein Lektin  
und/oder ein Antikörper ist.

8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7,  
dadurch gekennzeichnet, dass es mit einem weiteren  
20 Molekül fusioniert oder komplexiert ist, welches den  
gerichteten Transport zum Zielort, die Aufnahme in  
und/oder die Verteilung innerhalb der Zielzelle  
unterstützt.

9. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7 oder 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt  
ein Antisense-Oligonukleotid, ein DNase, eine  
25 Peptid-Nukleinsäure, ein Ribozym und/oder eine siRNA  
ist.

10. Erkennungsmolekül nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Antisense-  
Oligonukleotid durch Phosphothioatbindungen und/oder  
5 andere chemische Modifikationen verändert ist.

11. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Sequenzbereich der  
hTERT-mRNA, zu der das Erkennungsmolekül komplementär  
10 ist, aus der Gruppe umfassend 2183-2205, 2206-2225,  
2315-2334, 2317-2336, 2324-2346, , 2331-2350 und/oder  
2333-2352 ausgewählt ist.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein  
15 Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11,  
gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch  
verträglichen Träger.

13. Kit umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der  
20 Ansprüche 1 bis 11 und/oder eine pharmazeutische  
Zusammensetzung nach Anspruch 12.

14. Array umfassend ein Erkennungsmolekül nach einem der  
Ansprüche 1 bis 11 und/oder eine pharmazeutische  
25 Zusammensetzung nach Anspruch 12.

15. Verwendung eines Erkennungsmoleküls nach einem der  
Ansprüche 1 bis 11, eines Kits nach Anspruch 13  
und/oder eines Arrays nach Anspruch 14 zur Diagnose,  
30 Prophylaxe, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder  
Nachbehandlung von mit Zellwachstum, -differenzierung



und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten.

5 16. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ein Tumor  
ist.

10 17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein solider  
Tumor oder eine Leukämie ist.

15 18. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein  
Tumor des Urogenitaltraktes und/oder des  
Gastrointestinaltraktes ist.

20 19. Verwendung nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor ein  
Kolonkarzinom, ein Magenkarzinom, ein Pankreas-  
karzinom, , ein Dünndarmkrebs, ein Ovarialkarzinom,  
ein Zervikalkarzinom, ein Lungenkrebs, ein  
Nierenzellkarzinom, ein Hirntumor, ein Kopf-Halstumor,  
ein Leberkarzinom und/oder eine Metastase dieser  
Tumoren ist.

25 20. Verwendung nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet, dass der solide Tumor ein  
Mamma-, Bronchial-, Kolorektal- und/oder Prostata-  
karzinom und/oder eine Metastase dieser Tumoren ist.

21. Verwendung nach Anspruch 18,  
dadurch gekennzeichnet, dass der Tumor des  
Urogenitaltraktes ein Harnblasenkarzinom und/oder eine  
Metastase dieser Tumoren ist.

5

22. Verwendung nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Verlaufkontrolle eine  
Überwachung der Wirksamkeit einer Antitumorbehandlung  
ist.

10

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül in  
einer Kombinationstherapie verwendet wird.

15

24. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine Chemotherapie, eine Zytostatikabehandlung und/  
oder eine Strahlentherapie umfasst.

20

25. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine adjuvante biologisch-spezifizierte Therapieform  
umfasst.

25

26. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Therapieform eine  
Immuntherapie ist.

30

27. Verwendung nach einem Ansprüche 23 bis 26,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Kombinationstherapie  
eine Gentherapie und/oder eine Therapie mit einem

Erkennungsmolekül desselben oder eines anderen Zielmoleküls umfasst.

5 28. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und/oder Strahlen.

10 29. Verwendungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Hemmung der Vitalität, der Proliferationsrate von Zellen zur Induktion von Apoptose und/oder eines Zellzyklus-Arrests.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die  
5 gegen ein Gen einer katalytischen Untereinheit der humanen  
Telomerase gerichtet sind sowie die Verwendung dieser  
Erkennungsmoleküle zur Diagnose, Prophylaxe, Verminderung,  
Verlaufskontrolle von mit Zellwachstum, -differenzierung  
und/oder -teilung im Zusammenhang stehenden Krankheiten,  
10 wie beispielsweise Tumorerkrankungen.

## Literaturverzeichnis

5 Agrawal S, Zhao Q: Antisense therapeutics. Curr Opin Chem Biol (1998) 2: 519-28.

Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L: Reconstitution of human telomerase activity in vitro. Curr Biol (1998) 8: 177-80.

10 Boiziau C, Kurfurst R, Cazenave C, Roig V, Thuong NT, Toulme JJ: Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism. Nucleic Acids Res (1991) 19: 1113-9.

15 Crooke ST: Molecular mechanisms of action of antisense drugs. Biochim Biophys Acta (1999) 1489: 31-44.

20 Greider CW, Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell (1985) 43: 405-13.

25 Harley CB: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? Mutat Res (1991) 256: 271-82.

Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M: Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. Clin Cancer Res (1998) 4: 1603-8.

30 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science (1994) 266: 2011-5.

35

De Kok JB, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW: Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. *Int J Cancer* (2000) 87: 217-20.

5

Kole R, Sazani P: Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing. *Curr Opin Mol Ther* (2001) 3: 229-34.

10

Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB: Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* (1992) 225: 951-60.

15

Moser HE, Dervan PB: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* (1987) 238: 645-50.

20

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ: Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* (1998) 160: 645-59.

25

Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL: Catalytic nucleic acids: from lab to applications. *Pharmacol Rev* (2000) 52: 325-47.

Tamm I, Dorken B, Hartmann G: Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea? *Lancet* (2001) 358: 489-97.

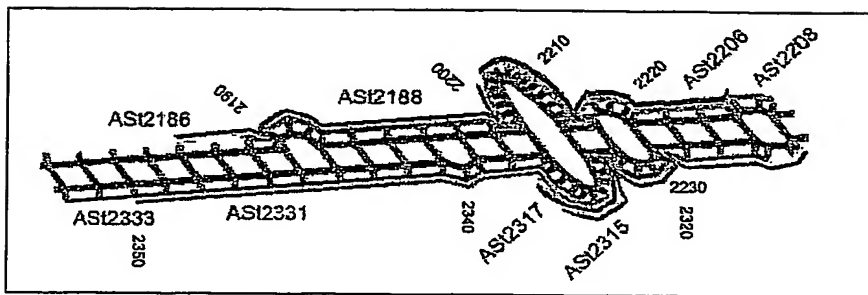


Abb. 1

AS-ODN gegen lokale Sekundärstrukturen der hTERT-mRNA

Dargestellt sind zwei gegenüberliegende ss-Strukturen (2201-14 und 2328-36 nt), gegen die jeweils vier AS-ODN gerichtet sind.

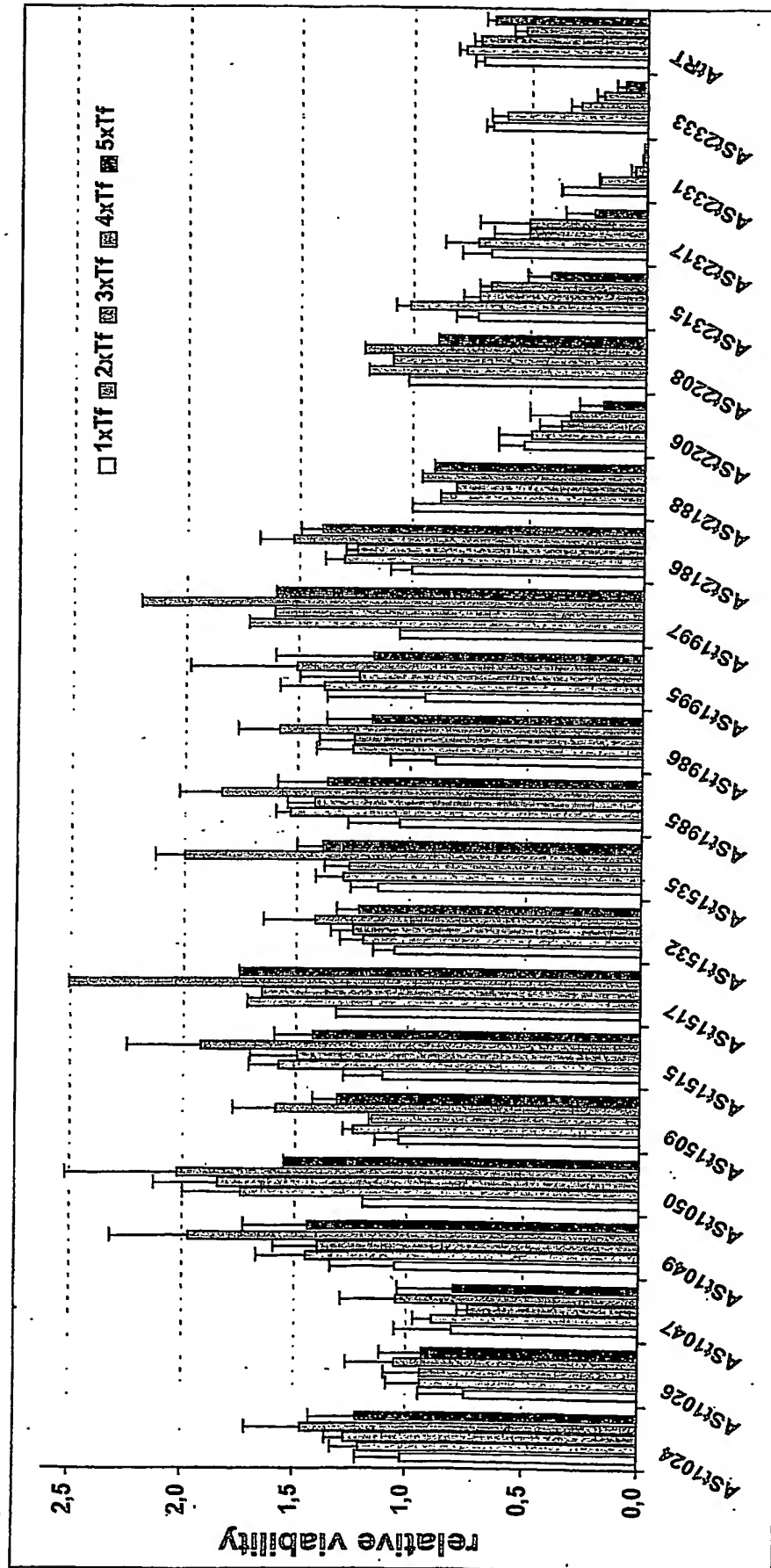


Abb. 2  
Einfluss von multiplen Anti-hTERT-Behandlungen mit verschiedenen AS-ODN auf die Viabilität von EJ28-Zellen



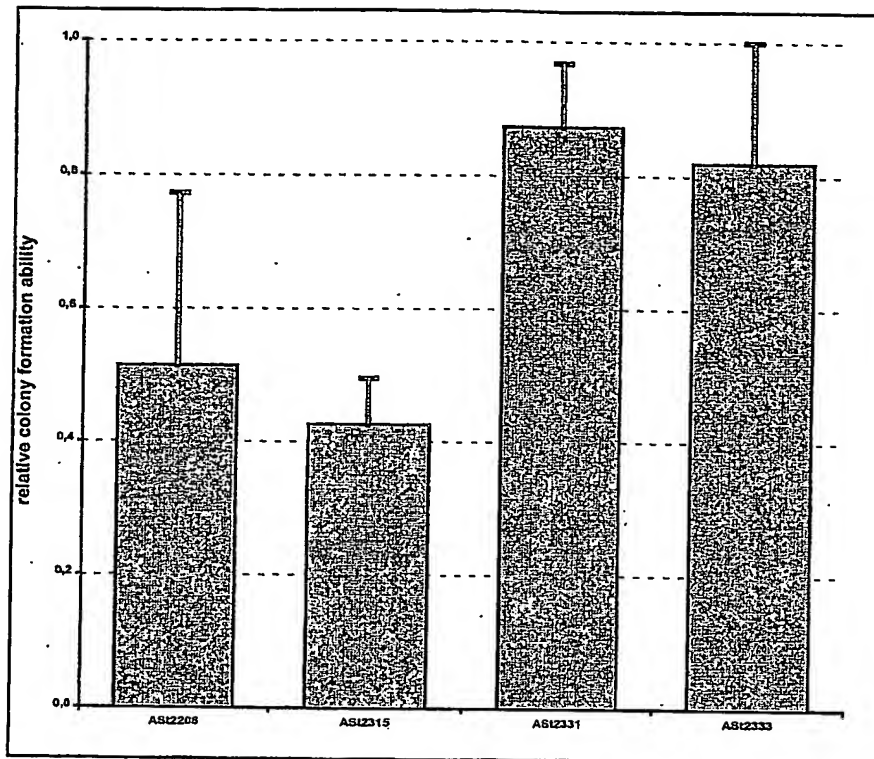


Abb. 3

Auswirkungen von zwei AS-ODN-Transfektionen auf das Koloniebildungsverhalten von EJ28-Zellen

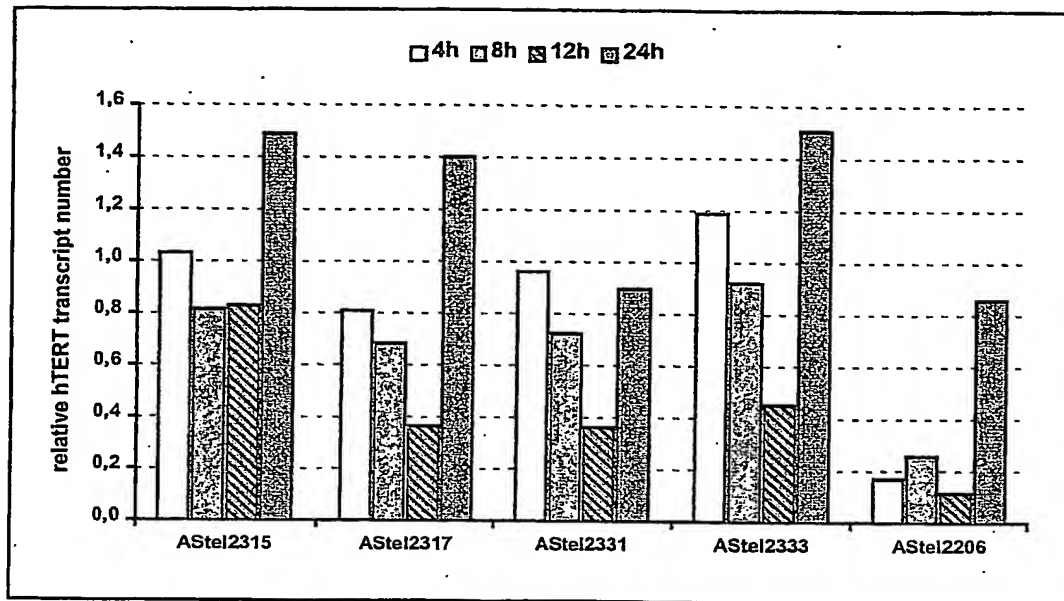


Abb. 4

Relatives Expressionsniveau AS-ODN behandelte EJ28-Zellen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ ~~SKewed/SLANTED IMAGES~~
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**